

All roads lead to thrombus formation : demystifying platelet signaling pathways

Citation for published version (APA):

Gilio, K. (2012). *All roads lead to thrombus formation : demystifying platelet signaling pathways*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20121112kg>

Document status and date:

Published: 01/01/2012

DOI:

[10.26481/dis.20121112kg](https://doi.org/10.26481/dis.20121112kg)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Platelets are the principal blood cell components implicated in thrombosis and hemostasis. Following vascular injury or activation, platelets form a thrombus at the damaged site, causing the cessation of bleeding. In the pathophysiological process of thrombosis at the site of a ruptured atherosclerotic plaque, uncontrolled thrombus formation can lead to vessel occlusion and result in heart attack or stroke. In platelets, many intracellular signaling pathways have been identified that contribute to platelet activation processes, like integrin activation, secretion, platelet aggregation and procoagulant activity (phosphatidylserine exposure). Unraveling which of these signaling roads lead to thrombus formation was endeavored in this thesis.

Chapter 1 gives a general overview of relevant mechanisms of platelet receptor activation and intracellular signaling pathways, leading to integrin activation, secretion and procoagulant activity. The precise role of the signaling collagen receptor, glycoprotein VI, in collagen-induced thrombus formation is extensively described, but that of the adhesive collagen receptor, integrin $\alpha 2\beta 1$, is less clear. In the signal transduction pathway induced by glycoprotein VI, phosphoinositide 3-kinase (PI3K) plays a key role in integrin $\alpha IIb\beta 3$ activation and platelet aggregation. However, which of the several PI3K isoforms is responsible for these responses remains to be clarified. This also holds for participation of the small GTPase Rap1b, which operates downstream of PI3K. The main phospholipid substrate of PI3K, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, also a substrate for phospholipase C, cleaving this into inositol trisphosphate and diacylglycerol. The latter activates members of the family of protein kinase C (PKC), which are implicated in almost all platelet responses. However, which of the various expressed PKC isoforms contributes to which platelet responses during thrombus formation, needs to be investigated. As Ca^{2+} is an important second messenger in the different stages of platelet activation, possible regulators of cytosolic Ca^{2+} mobilization are discussed as well.

To address the question whether collagen-mimetic peptides support flow-dependent thrombus formation, we used in chapter 2 triple-helical peptides consisting of hexapeptide sequences of the recognition site for integrin $\alpha 2\beta 1$, i.e. peptides with high-affinity (GF/LOGER), intermediate affinity (GLM/SGER), or low-affinity (GAO/SGER) binding. The hexapeptide sequence was incorporated in a backbone of repeated (GPP)_n sequences as a neutral control, or of (GPO)_n sequences to provide additional binding sites for glycoprotein VI. These triple-helical peptides were immobilized to glass in the presence or absence of von Willebrand factor to allow platelet interaction with glycoprotein Ib-V-IX. Whole blood perfusion at high shear rate showed that immobilized peptides containing both the high-affinity $\alpha 2\beta 1$ -binding motif GFOGER and the (GPO)_n motif supported platelet aggregation and procoagulant activity, even in the absence of von Willebrand factor. With peptides containing only one of these motifs, co-immobilized von Willebrand factor was needed for thrombus formation. Peptides with intermediate affinity or low-affinity $\alpha 2\beta 1$ -binding motifs formed procoagulant thrombi only if both (GPO)_n and von Willebrand factor were present. At a low-shear rate, immobilized peptides with high- or low-affinity $\alpha 2\beta 1$ -binding motifs mediated formation of thrombi with procoagulant platelets only in combination with (GPO)_n. Taken together, chapter 2 indicates that collagen-mimetic, triple-helical peptides

effectively and efficiently can take over the functions of native collagens in mediating platelet adhesion and activation via the receptors glycoprotein VI and $\alpha 2\beta 1$. Herein, glycoprotein VI exerts a signaling rather than adhesive function, whereas $\alpha 2\beta 1$ and von Willebrand factor determine the adhesion of platelets under flow conditions.

In chapter 3, we identified $PI3K\alpha$ and β as the main $PI3K$ isoforms for full phospholipase C activation, inositol trisphosphate formation and further signaling evoked by glycoprotein VI. We could not confirm a role of these isoforms in Ca^{2+} entry from the extracellular medium. In platelets from mice lacking $p85\alpha$ (i.e. a main regulatory subunit of $PI3K\alpha/\beta$), collagen-induced Ca^{2+} signaling and thrombus formation were severely impaired. Applying a pharmacological approach with high affinity inhibitors of $PI3K\alpha$ (PIK-75) or $PI3K\beta$ (TGX-221), a functional non-redundancy of these isoforms in glycoprotein VI-induced platelet activation was found, since the inhibitors together did not have an additional effect on Akt phosphorylation, secretion, Ca^{2+} signaling, procoagulant activity, and thrombus formation. Furthermore, chapter 3 provides evidence of a direct role for glycoprotein VI in Rap1b activation in both human and mouse platelets. This direct contribution could be attributed to activation of the $PI3K\alpha$ and β isoforms. Because $PI3K$ inhibitors still suppressed integrin $\alpha IIb\beta 3$ activation and platelet aggregation in Rap1b^{-/-} platelets, we concluded that there also exists a $PI3K$ -mediated, Rap1b-independent pathway of integrin activation. This pathway may involve $PI3K\alpha/\beta$ -dependent stimulation of phospholipase $Cy2$, which possibly contributes to Ca^{2+} - and PKC-mediated activation of integrin $\alpha IIb\beta 3$. Together, these findings provide a new mechanistic explanation for the antithrombotic effect of $PI3K$ inhibition and make $PI3K\alpha/\beta$ interesting targets for anti-platelet therapy.

By applying both a genetic and pharmacological approach, in chapters 4 and 5 we identified the roles of the different PKC isoforms, i.e. the conventional ($PKC\alpha$ and β) and novel ($PKC\delta$ and θ) isoforms, in the process of thrombus formation. Chapter 4 reveals a key role for $PKC\alpha$ in regulating granule biogenesis and exocytosis. In addition, it is shown that glycoprotein VI- and thrombin-induced secretion of α -granules, integrin $\alpha IIb\beta 3$ activation, and platelet aggregation are positively regulated by $PKC\alpha$. On the other hand, as presented in chapter 4, $PKC\alpha$ does not affect platelet adhesion and spreading on collagen. The inhibitory effects of $PKC\alpha$ ablation on granule secretion and thrombus formation favor the thought of using $PKC\alpha$ as a drug target for antithrombotic therapy. In chapter 5, the comparison of mouse platelets lacking different isoforms of PKC, by measuring thrombus formation under whole blood flow conditions, reveals distinct, non-redundant roles of the isoforms. It is concluded that the conventional PKCs ($PKC\alpha$ and β) promote, and the novel PKCs ($PKC\delta$ and θ) inhibit thrombus formation on collagen. Considering Ca^{2+} signaling and procoagulant activity, these responses were both diminished in platelets from $PKC\alpha^{-/-}$ and $PKC\beta^{-/-}$ mice. These findings are supported by pharmacological studies with human platelets, using Gö6976 and a $PKC\beta$ inhibitor, respectively. On the contrary, platelets from mice deficient in $PKC\theta$, and to a lesser extent $PKC\delta$, were increased in collagen-dependent granule secretion and thrombus formation. This was supported by enhanced Ca^{2+} responses and increased phosphatidylserine exposure of $PKC\theta^{-/-}$ platelets. Comparable results were obtained with human platelets pretreated with a $PKC\theta$ inhibitor or with the $PKC\delta$ inhibitor

rottlerin. Regarding chapters 4 and 5, we propose that the conventional PKC α/β isoforms are essential for collagen-induced granule secretion, phosphatidylserine exposure, and thrombus formation, while especially PKC θ negatively regulates these processes.

We investigated in chapter 6 whether the Ca²⁺-sensing proteins STIM1 and 2 and the Ca²⁺-selective channel Orai1 are key Ca²⁺ regulatory components in platelet phosphatidylserine exposure and thrombus formation upon stimulation of the collagen and thrombin receptors. The studies were carried out using chimeric mice with platelets deficient in STIM, STIM2, or Orai1. It was demonstrated that deficiency in either STIM1 (but not STIM2) or Orai1 greatly reduced glycoprotein VI-induced Ca²⁺ signaling, phosphatidylserine exposure, and thrombus formation under flow conditions in the absence of coagulation. In the presence of high thrombin concentrations, these platelet responses tended to normalize. These findings jointly suggest that the glycoprotein VI-induced Ca²⁺ entry pathway mediated by STIM1 and Orai1 becomes redundant in the regulation of thrombus formation under conditions where thrombin acts as co-agonist.

In chapter 7, the signaling processes were studied by which phosphatidylserine-exposing platelets inactivate or close integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$. In particular, we examined the possible roles in integrin closure of elevated Ca²⁺, Src family kinases, mitochondrial permeability transition pore formation, and calpain-dependent protein cleavage. The data showed that both Ca²⁺ elevation (with likely a role of mitochondrial dysfunction) and calpain activity are involved in the control of integrin closure, although also the process of phosphatidylserine exposure itself may contribute to integrin closure. Key findings of this thesis as well as their possible clinical significance, in relation to the current literature, are discussed in chapter 8. It is argued that thrombus formation is delicately regulated by various cooperating signaling pathways with sometimes redundant, sometimes non-redundant roles of specific isoforms of PI3K, PKC and Ca²⁺-regulating proteins in platelets. Overall, the studies in this thesis help to demystify the current uncertainty of precise signaling pathways towards thrombus formation. In anti-thrombotic treatment the present antiplatelet drugs are only limitedly effective and have as side effect an increased risk of bleeding. To develop personalized target-specific drugs, which have lower side effects, more precise knowledge of the process of thrombus formation and platelet signaling is essential. The present insight, described in this thesis, hence may contribute to future improvements in the treatment of arterial thrombosis.

Samenvatting

Als kleinste cellulaire bloedcomponent hebben bloedplaatjes een centrale rol in de processen van trombose en hemostase. Wanneer een bloedvat beschadigd wordt, vormen geactiveerde bloedplaatjes aldaar een trombus waardoor de bloeding gestelpt wordt. De pathofysiologische tegenhanger van hemostase is trombose. Hierbij ontstaat ongecontroleerde trombusvorming, bijvoorbeeld ten gevolge van een ruptuur van een atherosclerotische plaque, mogelijk leidend tot bloedvatafsluiting resulterend in een hartinfarct of een beroerte. In bloedplaatjes zijn tot dusver vele intracellulaire signaleringspaden geïdentificeerd, die bijdragen aan de verschillende activatieprocessen van deze cellen, waaronder integrine-activatie, secretie, plaatjesaggregatie en stollingsbevorderende activiteit (oppervlakte-expositie van fosfatidylserine, PS). Het doel van deze thesis is meer inzicht te krijgen in het belang van die signaleringspaden leidend tot trombusvorming.

Hoofdstuk 1 geeft een algemeen overzicht van de relevante mechanismen van receptoractivatie en intracellulaire signaleringspaden in bloedplaatjes, betrokken bij integrine-activatie, secretie en procoagulante activiteit. De exacte rol van de signalerende collageenreceptor, glycoproteïne VI, in het proces van collageen-geïnduceerde trombusvorming was eerder al beschreven. Die van de adhesieve collageenreceptor integrine $\alpha 2\beta 1$ daarentegen is minder duidelijk. In het signaaltransductiepad geïnduceerd door glycoproteïne VI spelen eiwitten van de familie van fosfoïnositide 3-kinase (PI3K) een centrale rol bij de activatie van integrine $\alpha IIb\beta 3$ en de daaropvolgende bloedplaatjesaggregatie. Maar welke van de verschillende PI3K isovormen verantwoordelijk zijn voor deze activatieresponsen dient nog onderzocht te worden. Dit geldt ook voor de bijdrage van het onder PI3K functionerende regeleiwit, de GTPase Rap1b. Het belangrijkste fosfolipidensubstraat van PI3K, fosfatidylinositol 4,5-bisfosfaat, is ook een substraat voor fosfolipase C, die dit fosfolipide knipt in diacylglycerol en inositol-trifosfaat. Diacylglycerol activeert eiwitten van de proteïne kinase C (PKC) familie, die betrokken zijn bij zowat alle activatieresponsen in bloedplaatjes. Maar welke van de verschillende PKC isovormen betrokken zijn bij die verschillende responsen tijdens trombusvorming, dient nog uitgezocht te worden. Aangezien het ion Ca^{2+} bekend staat als een belangrijke intracellulaire boodschapper bij de verschillende fasen van bloedplaatjesactivatie, worden in dit hoofdstuk ook de mogelijke regulatoren van cytosolaire Ca^{2+} -mobilisatie besproken.

Voor het oplossen van de vraag of collageen-nabootsende peptiden trombusvorming in stromend bloed ondersteunen, zijn in hoofdstuk 2 enige triple-helix peptiden gebruikt bestaande uit hexapeptidesequenties waaraan integrine $\alpha 2\beta 1$ kan binden, dat wil zeggen peptiden met een hoge (GF/LOGER), intermediaire (GLM/SGER) of lage (GAO/SGER) affiniteit voor dit integrine. Deze hexapeptidesequenties zijn ingebouwd in een structuur van herhaalde (GPP)_n-sequenties als controle-eiwit, of van (GPO)_n-sequenties om een additionele bindingsplaats voor glycoproteïne VI te creëren. De triple-helix peptiden werden op glas geïmmobiliseerd in de aan- of afwezigheid van von Willebrand factor (vWF), waardoor al dan niet interactie van bloedplaatjes met glycoproteïne Ib-V-IX mogelijk werd. Bloeddoorstroming bij hoge afschuifsnelheden over deze eitwitoppervlakken toonde aan dat geïmmobiliseerde peptiden, die zowel het hoge-affiniteit $\alpha 2\beta 1$ -bindingsmotief GFOGER als de sequentie (GPO)_n bevatten, de aggregatie en procoagulante activiteit van

bloedplaatjes kunnen opwekken, zelfs in de afwezigheid van vWF. Peptiden die enkel een van beide motieven bevatten dienden gecoïmmobiliseerd te worden met vWF om een trombus te kunnen vormen. Peptiden met intermediaire of lage affiniteitsbinding voor $\alpha 2\beta 1$ stimuleerden de vorming van procoagulante trombi alleen in de aanwezigheid van (GPO)_n-sequenties en vWF. Bij lage afschuifsnelheden stimuleerden geïmmobiliseerde peptiden met hoge- of lage-affiniteit $\alpha 2\beta 1$ -bindende motief, enkel in combinatie met (GPO)_n, de vorming van trombi met procoagulante bloedplaatjes. Samengevat toont hoofdstuk 2 aan dat collageen-nabootsende, triple-helix peptiden effectief en efficiënt de functie kunnen overnemen van collageen in bloedplaatjesadhesie en -activatie via glycoproteïne VI en integrine $\alpha 2\beta 1$. Hieruit blijkt dat glycoproteïne VI eerder een signalerende dan een adhesieve functie heeft, terwijl integrine $\alpha 2\beta 1$ en de vWF-receptor glycoproteïne Ib-V-IX zorgen voor adhesie van bloedplaatjes onder stromingsomstandigheden.

In hoofdstuk 3 zijn PI3K α en β geïdentificeerd als de belangrijkste PI3K isovormen noodzakelijk voor activatie van fosfolipase C, vorming van inositol-trifosfaat en daaropvolgende signalering opgewekt door glycoproteïne VI. Een mogelijke bijdrage van deze isovormen in de Ca²⁺-instroom vanuit het extracellulaire milieu kon niet worden bevestigd. In bloedplaatjes van muizen zonder het eiwit p85 α (de regulatoire component van PI3K α/β) bleken de collageen-geïnduceerde Ca²⁺-signaling en trombusvorming ernstig verstoord. In een farmacologische benadering met selectieve, hoge affiniteits-remmers van PI3K α (PIK-75) of PI3K β (TGX-221) kon worden aangetoond dat de gelijktijdige werking van beide isovormen nodig is voor bloedplaatjesactivatie door glycoproteïne VI. Bewijs hiervoor was ondermeer dat de combinatie van deze remmers geen additioneel effect had op de processen van Akt fosforylatie, Ca²⁺-signaling, plaatjessecretie, procoagulante activiteit en trombusvorming. Bovendien laat hoofdstuk 3 zien dat er een directe rol is van glycoproteïne VI in de activatie van Rap1b, zowel bij humane plaatjes als bij muizenplaatjes. Deze bijdrage loopt via de isovormen PI3K α en β . Omdat ook in Rap1b^{-/-} muizen remming van PI3K nog steeds van invloed was op de $\alpha IIb\beta 3$ -activatie en bloedplaatjesaggregatie, kan geconcludeerd worden dat er een alternatieve Rap1b-onafhankelijke signaleringsroute voor integrine-activatie bestaat middels PI3K. Deze route zou kunnen verlopen door middel van PI3K α/β -afhankelijke stimulatie van fosfolipase Cy2, met als gevolg een Ca²⁺/PKC-gemedieerde activatie van integrine $\alpha IIb\beta 3$. Recapitulerend geven bovenstaande bevindingen een nieuwe mechanistische verklaring voor het antitrombotische effect van PI3K α/β remming, waarmee deze eiwitten mogelijk een effectief doelwit zijn voor anti-bloedplaatjestherapie.

Door genetische en farmacologische benaderingen werden in de hoofdstukken 4 en 5 de functies van de verschillende isovormen van PKC geïdentificeerd in het proces van trombusvorming. Dit betreft de conventionele isovormen PKC α en β , en de 'nieuwe' isovormen PKC δ en θ . Hoofdstuk 4 onthult een sleutelrol voor de isovorm PKC α in de biogenese van opslag-granula en in de secretie van de inhoud van deze granula. Aangetoond werd dat onder invloed van glycoproteïne VI en trombine de secretie van α -granula, evenals de integrine $\alpha IIb\beta 3$ -activatie en plaatjesaggregatie positief gereguleerd worden door PKC α . Evenwel heeft PKC α geen invloed op bloedplaatjesadhesie en -spreiding over een collageenop-

pervlak. De sterk stimulerende bijdrage van PKC α op bloedplaatjesactivatie en trombusvorming ondersteunen het idee om te onderzoeken of PKC α een goed medicatiedoelwit is voor anti-trombotische therapie. In hoofdstuk 5 zijn muizenbloedplaatjes met een defecte expressie van één van de verschillende PKC isovormen met elkaar vergeleken door meting van de trombusvorming in stromend bloed. Op grond van de resultaten kan worden vastgesteld dat de conventionele en nieuwe isovormen functioneel niet uitwisselbaar zijn. De conventionele PKCs (PKC α en β) bevorderen de trombusvorming op collageen, terwijl de nieuwe PKCs (PKC δ and θ) dit proces onderdrukken. Voorts waren de Ca²⁺-signalering en procoagulante activiteit gereduceerd in bloedplaatjes van muizen deficiënt in PKC α of PKC β . Deze bevindingen werden ondersteund door farmacologische studies met humane bloedplaatjes en remmers van deze isovormen (Gö6976 en PKC β remmer). Anderzijds werd een toename geconstateerd van de granula-secretie en de trombusvorming bij muizen met een deficiëntie in PKC θ of, in mindere mate, PKC δ . In overeenstemming hiermee waren de Ca²⁺-responsen en procoagulante activiteit toegenomen bij PKC θ ^{-/-}. Vergelijkbare resultaten werden verkregen met humane bloedplaatjes behandeld met een PKC θ remmer of met de PKC δ remmer rottlerin. Op basis van de bevindingen in hoofdstukken 4 en 5 is gepostuleerd dat de conventionele PKC α/β isovormen essentieel zijn voor collageengeïnduceerde granula-secretie, procoagulante activiteit (PS-expositie) en trombusvorming, terwijl vooral PKC θ deze processen negatief reguleert.

In hoofdstuk 6 is onderzocht of de Ca²⁺-gevoelige eiwitten STIM1 en STIM2 en het Ca²⁺ selectieve plasmamembraan-kanaal Orai1 een sleutelrol kunnen vervullen bij PS-expositie en trombusvorming bij bloedplaatjesstimulatie met collageen en trombine. Deze studies werden uitgevoerd met chimere muizen met bloedplaatjes die deficiënt waren in STIM1, STIM2 of Orai1. Aangetoond is dat deficiëntie in ofwel STIM1 (doch niet STIM2) ofwel Orai1 leidt tot een sterk verminderde glycoproteïne VI-geïnduceerde Ca²⁺-signalering en trombusvorming in stromend bloed onder condities waarbij trombine geïnactiveerd is. Echter bij hoge trombinevorming (en bloedstolling) bleken deze responsen van bloedplaatjes terug normaal. Deze bevindingen wijzen op een compensatoire rol van trombine als 'backup' van de glycoproteïne VI-geïnduceerde Ca²⁺-instroom via Orai1/STIM1 bij de trombusvorming.

Hoofdstuk 7 beschrijft onderzoek naar signaleringsprocessen die verantwoordelijk zijn voor de sluiting van geactiveerde integrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ in PS-exponerende bloedplaatjes. In het bijzonder werd de rol van een verhoogde Ca²⁺ concentratie bestudeerd als mogelijke regulator voor integrine-sluiting, maar daarnaast ook de mogelijke bijdragen van Src proteïne kinasen, vorming van de mitochondriële permeabiliteitstransitieporie en van het Ca²⁺-afhankelijk cellulaire protease calpain. De data tonen aan, dat zowel een blijvende verhoging van intracellulair Ca²⁺ (met vermoedelijk een rol van mitochondriële permeabiliteit) als de protease-activiteit van calpain betrokken zijn bij de controle van integrine-sluiting. Daarnaast is niet uitgesloten dat ook het proces van PS-expositie zelf bijdraagt aan het sluiten van de integrines.

De belangrijkste bevindingen van dit proefschrift en de mogelijke klinische relevantie daarvan worden in relatie tot de recente literatuur besproken in hoofdstuk 8. Beargumenteerd wordt dat trombusvorming een delicaat gereguleerd proces is, waarbij verschillende

signaleringspaden al dan niet samenwerken of overlappen, en waarbij de verschillende isovormen van PI3K, PKC en STIM/Orai soms vervangbaar, soms complementair en soms tegengesteld zijn in werking. De huidige anti-trombotische medicatie gericht op bloedplaatjes is maar ten dele effectief, en heeft als belangrijke complicatie een verhoogd risico op bloedingen. Om een betere gepersonaliseerde medicatie tegen bloedplaatjes te ontwikkelen met minder bijwerkingen, is een goede kennis essentieel van het complexe proces van trombusvorming en de bloedplaatjesactivatie. De nieuwe inzichten beschreven in dit proefschrift kunnen mogelijk helpen om te komen tot een verbeterde behandeling van arteriële trombose.

